Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau
Dir.: Prof. Dr. Blumenberg

Beiträge zur Biologie der Leptotricheen der menschlichen Mundhöhle

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der Schlesischen
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt von

Rudolf Pürschel
Marineassistenzarzt

Breslau 1940

Breslauer Genossenschafts-Buchdruckerei E. G. m. b. H., Breslau 1, Ursulinerstr. 1

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Breslau.

Referent: Prof. Dr. Blumenberg

Dekan: Prof. Dr. Gottron.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner lieben Mutter!

A. Bisherige Ergebnisse.

1. Definition der Leptotricheen.

Im allgemeinen verstand man bisher unter Leptothrix buccalis einen harmlosen Saprophyten, der in der normalen Mundhöhle fast jedes erwachsenen Menschen in Sputum, Zahnbelag und auf den Tonsillen zu finden ist. Er gehört, wie Gins, Brailowsky-Lounkewicz und Küster in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen haben, zu den normalen anaeroben Flora der menschlichen Mundhöhle, gleichzeitig mit Bact. fusiforme, Bact. melaninogenicum, Spirillen und Vibrionen.

Morphologisch handelt es sich um 0,3—0,6 μ dicke und 30—80 μ lange Fäden, die keinerlei Verzweigungen oder Scheinverzweigungen aufweisen. Mit den bekannten Färbemitteln wie Fuchsin, Methylenblau usw. lassen sie sich gut darstellen und verhalten sich gramlabil. Bei genauerer Betrachtung bestehen die Fäden aus schmalen, langen Stäbchen, die sich, durch eine gemeinsame Schleimscheide umschlossen, zu langen Ketten aneinanderreihen.

Wie schon gesagt, galten die Leptotricheen bisher als harmlose Saprophyten, die spezifisch pathogene Eigenschaften nicht besitzen sollten. Sie werden nur selten als Parasiten wirksam und sind daher nach dem Vorgang von Gotschlich in die Klasse der „unfertigen Infektionserreger" zu rechnen, deren Fähigkeit, sich im lebenden Gewebe zu vermehren und dadurch krankmachend zu wirken, noch sehr unvollkommen entwickelt ist (Gotschlich). Vereinzelte Krankheitsfälle, bei denen Leptothrix gefunden worden ist, sollen weiter unten Erwähnung finden. Erst in allerjüngster Zeit hat Gins auf Grund langjähriger Untersuchungen auf Zusammenhänge hingewiesen, die bei der Entstehung der Zahnkaries zwischen dieser und der Anwesenheit der Leptothrix in der menschlichen Mundhöhle zu bestehen scheinen. Die Mitteilungen über die Biologie der Leptotricheen und ihr kulturelles Verhalten sind im Schrifttum äußerst spärlich und unvollkommen, da die Mikroorganismen lange Zeit als unzüchtbar galten. Es sind auch nur ganz wenige

Fälle einer gelungenen Züchtung aus neuerer Zeit berichtet, die weniger wegen irgendeiner klinischen Bedeutung dieser Mikroorganismen, sondern eher als bakteriologische Kuriosa einem kleinen Gremium interessierter Fachkreise mitgeteilt wurden.

2. Überblick über Systematik, Morphologie, Züchtung und Kultur.

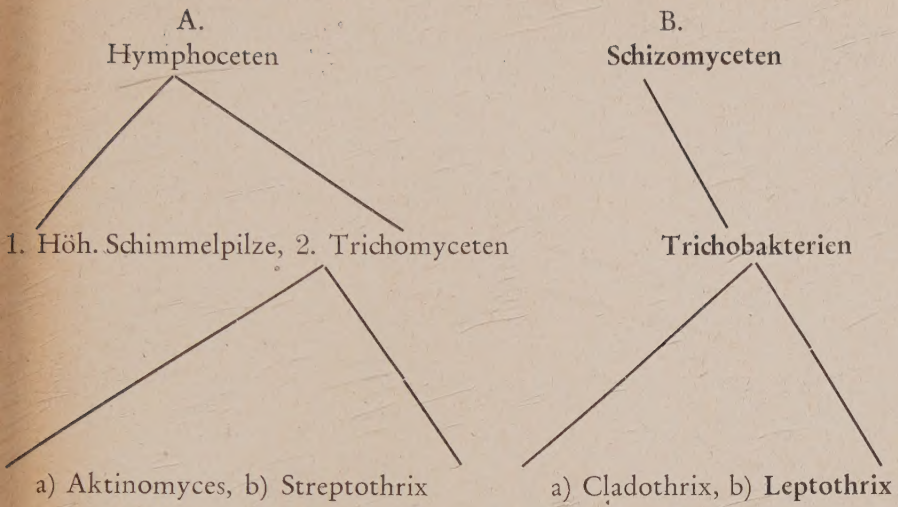
Die Kenntnis von den Fadenbakterien ist bereits sehr alt. Schon der alte niederländische Autodidakt Leeuwenhoek hat sie, wie Kruse berichtet, gesehen und beschrieben. Die Bezeichnung „Leptothrix" stammt von Kützing, der erstmals eine besondere Species, die er L. ochracea nannte, in eisenhaltigen Gewässern nachwies und untersuchte. Sie wurden später deswegen auch „Eisenbakterien" genannt. Wegen ihrer Schleimscheide wurden sie auch als „Desmobakterien" (Lehmann-Neumann) oder „Clamydobakterien" (Migula) bezeichnet.

Unter diesen Sammelbegriffen faßte man aber außer Leptothrix noch Cladothrix, Beggiotoa und Crenothrix zusammen, ohne eine genaue Abgrenzung im einzelnen durchzuführen.

Über die Systematik besteht besonders in der älteren Literatur eine gewisse Diskrepanz der Ansichten. Ein klares Bild aus den sich zum Teil widersprechenden Ansichten formt erst Petruschky. Er gibt in seinem Aufsatz in der 2. Auflage des „Handbuches der pathogenen Mikroorganismen" von Kolle-Wassermann (1913) eine Zusammenfassung aller bisherigen Meinungen und die daraus resultierende endgültige Eingliederung der Leptotricheen in die Systematik der Kleinlebewesen. Danach kommt Petruschky zu dem Schluß, daß nicht alle fadenbildenden Mikroorganismen ohne weiteres in die Gattung der Hyphomyceten einzuordnen sind. Es bestehen vielmehr noch besondere Zwischenstufen der Entwicklung und Übergänge von den niederen Schizomyceten zu den höheren Hyphomyceten. Petruschky übernimmt daher den von v. Baumgarten eingeführten Namen „Trichobakterien" für den Teil der Übergangsformen, die mehr dem Formenkreis der Schizomyceten entsprechen. Zu diesen Trichobakterien gehören die beiden Species: Leptothrix und Cladothrix.

Die mehr dem Formenkreis der Hyphomyceten entsprechenden Kleinlebewesen werden als „Trichomyceten" bezeichnet. Dazu gehören Aktinomyces und Streptothrix.

Es ergibt sich damit für Petruschky folgendes Bild der Systematik:



Die Sammelbezeichnung „Trichobakterien" soll folgendes zum Ausdruck bringen:

1. Es handelt sich um fadenbildende Mikroorganismen.
2. Diese Kleinlebewesen besitzen jedoch noch den Charakter von Stäbchen.
3. Die Fortpflanzung geschieht noch in der einfachsten Form, nämlich in der Spaltung einzelliger Individuen in einer Ebene.
4. Es finden sich bei den Trichobakterien keinerlei Verzweigungen, Konidien oder die Bildung von Hyphen, wie sie bei den Pilzen zu finden sind.

Nach Petruschky ergeben sich nun folgende Charakteristika der vier Gruppen der Trichomyceten und Trichobakterien:

Mit echter Verzweigung.

1. Aktynomyces. Im lebenden Gewebe dicht verfilztes Geflecht von unregelmäßig dicken und gebogenen Fäden, Drusenbildung. Manchmal auch einzelne unregelmäßig geformte Stäbchen mit Anschwellungen an den Enden. Anaerobe und aerobe Formen. Oft hirschgeweihartige Bildungen. Grampositiv bzw. gramlabil. Tierpathogenität.

2. Streptothrix. Ziemlich lange, unregelmäßig dicke Fäden. Keine Drusenbildung. Gelegentlich geringe Säurefestig-

keit. In den Kulturen echte Verzweigungen. Strenge Anaerobier. Gelegentlich Tierpathogenität.

Ohne echte Verzweigung.

3. Cladothrix. Dicke, leicht gekrümmte Fäden. Falsche Verzweigungen (seitliche Sprengung der Hülle zur Fortsetzung des Längenwachstums in anderer Richtung). Hülle nachweisbar.

Ohne Verzweigung.

4. Leptothrix. Zarte, mehr oder minder lange Fäden, gleichmäßig dick. Durch Färbung Hülle nachweisbar. Keine Eigenbewegung. Gramlabil. Die Fäden sind nur wenig gekrümmt und zeigen geringe Teilungstendenz. Es finden sich aerobe und anaerobe Formen, keine Tierpathogenität. Außerordentlicher Formenreichtum.

Geht man das sehr spärliche Schrifttum über die Leptotricheen durch, so fällt zunächst ein Aufsatz aus der älteren Literatur von v. Miller auf („Untersuchungen an den Mikroorganismen der Mundhöhle", zit. nach Kolle-Wassermann, Hdb. d. path. Mikroorg., 2. Aufl.). Während alle anderen Autoren unter „Leptothrix" nur eine bestimmte Species verstehen, will v. Miller Leptothrix nur als einen Gattungsbegriff auffassen, der seinerseits morphologisch gesehen in völlig verschiedene Arten zerfällt. Er teilt die Leptotricheen in zwei Gruppen ein:

1. züchtbare,
2. unzüchtbare.

Zu den nicht züchtbaren zählt er die konstanten Bewohner der Mundhöhle, die er als „L. innominata" bezeichnet. Zwei weitere Arten, „L. maxima" und „L. gigantea", sollen mit den Mundhöhlenbewohnern dadurch charakterisiert sein, daß mit durch Milchsäure leicht angesäuerter Lugolscher Lösung eine Violettfärbung der Fäden eintritt.

Dieser Auffassung und Einteilung nach v. Miller sind auch Küster und Fürbringer gefolgt. Die Ergebnisse der neueren Forschung widerlegen jedoch den Millerschen Standpunkt, der nur noch historisches Interesse hat.

Von den Versuchen einer Züchtung der Leptotricheen seien folgende mitgeteilt:

1. Der älteste und erste Versuch einer Züchtung ist der des Russen Arustamow. Mit Hilfe des Plattenkulturverfahrens auf gewöhnlichem Nähragar züchtete er zwei sich etwas ver-

schieden verhaltende Arten. Eine aus dem Harn eines Tabikers, die andere aus Tonsillenpfröpfen.

Morphologisch ähnelten sich die beiden Arten sehr, jedoch war der aus dem Harn gezüchtete Stamm ausgesprochen anaerob, während der andere nur aerob wuchs. Auch kulturell wiesen beide kleine Verschiedenheiten auf. Der anaerobe Stamm entwickelte kaum sichtbare, winzige Kolonien, während die des aeroben kräftig und gut sichtbar waren. In beiden Fällen waren die Kolonien auf Agar durchsichtig und sahen sternförmig aus; das dunklere Zentrum bestand bei beiden aus einem Konvolut von Fäden, die sich nach dem Rande hin in radiäre Fäden auflösten. Die anaerobe Art zeigte auf schwach saurem Agar ein bemerkenswert besseres Wachstum.

Bei beiden Arten stellte Arustamow eine durchschnittliche Länge von 8—50 μ und eine durchschnittliche Dicke von 0,5—0,6 μ fest.

In flüssigen Nährböden wuchsen die Fäden zur größten Länge aus, während auf Agar kürzere, aber stärker gewundene, zum Teil Schlingenbildung zeigende Fäden auftraten. Bei dem anaeroben Stamm war eine Querteilung niemals zu beobachten, dagegen zerfielen ältere Kulturen in glänzende Körnchen, die sich nicht mehr fortpflanzen ließen.

Der anaerobe Stamm zeigte deutliche Querteilung und gedieh bei Zimmertemperatur vorzugsweise an der Oberfläche der Nährböden sowie auf Gelatine bei Zimmertemperatur, wobei die Gelatine langsam verflüssigt wurde. Beide Arten waren unbeweglich. Tierversuche wurden nicht angestellt.

2. Züchtungsversuche, bei denen als Ausgangsmaterial Sputum und Zahnschleim benutzt wurde, sind von Dimitrijevicz-Speth mitgeteilt worden. Es gelang ihm, aus diesem Material sehr leicht verdünnt angelegte Stichkulturen in 4%iger Agar-Gelatine Leptothrix zu züchten. Bereits nach 24 Std. breiteten sich büschelförmig lange Strahlen in das Nährmedium hinein. Nach mehreren Tagen wuchsen diese Büschel wellig aus und verdickten sich am Ende keulenförmig, ähnlich wie das Lupenbild von Aktinomyces. Besonders im unteren anaeroben Teil der Röhrchen war ein kräftiges Wachstum zu beobachten. Gefärbte Präparate zeigten das bekannte Bild von Leptothrix ohne jede Besonderheit. Der hängende Tropfen brachte jedoch eine Überraschung. Man sah hier nicht zylindrische Schläuche, sondern gedrehte Bänder. Ferner zeigte sich, daß die in der Kultur längeren Fäden von einer stark lichtbrechenden Kugel ausgingen. In jüngeren Kulturen waren auch freie Kugeln ohne

Fäden zu finden. Echte Verzweigungen fehlten. Beweglichkeit der Mikroorganismen war nicht zu beobachten.

Färberisch konnten die im hängenden Tropfen gesehenen Kugeln und Bandformen nicht nachgewiesen werden. Dimitrijevicz-Speth erklärt diese auffallende Erscheinung damit, daß durch die Prozedur des Fixierens und Färbens eine Zerstörung der Elemente bewirkt wurde.

Die Lebensdauer der Kulturen war nur gering. Das Temperaturoptimum lag bei 37°, bei 70° starben die Mikroorganismen bereits in 3 Minuten ab.

3. Aus dem gleichen Material hat Gins Fadenbakterien gezüchtet, die er zu den Leptotricheen rechnete. Gins war dabei mit seiner endgültigen Diagnose sehr vorsichtig; er gab dem von ihm gefundenen Stamm die vorläufige Bezeichnung „Gi XIII". Nach seiner Auffassung genügt die Fadenbildung ohne Verzweigung nicht als ausschlaggebendes Zeichen für die Diagnose „Leptothrix". Es muß vielmehr ein Unterschied zwischen der im Ausstrich und der im Klatschpräparat beobachteten Fadenbildung gemacht werden. Nur die letztere berechtigt nach Gins zur Diagnose „Leptothrix".

Die Mikroorganismen wuchsen anaerob auf Blutagar. Nach Rein-Züchtung traten auf der 24 Std. bebrüteten Platte unregelmäßige, zerstreut liegende Fäden auf, die sich nach einigen Tagen zu kleinen Kolonien entwickelten. Zuerst sahen diese sternförmig aus und trugen dann später in der Mitte ein erhabenes Knöpfchen.

In flüssigen Nährmedien war nur ein geringes Wachstum zu erkennen. Nach 2 Wochen trübte sich die Bouillon gleichmäßig. Von den auf Blutagarplatten angelegten Reinkulturen strömte nach einigen Tagen ein säuerlicher Geruch aus.

Im Präparat sah man die Fäden zu Knäueln gewunden. Neben kurzen Fäden waren auch lange spießförmige Stäbchen zu sehen, die sehr an fusiforme Bazillen erinnerten. Diese waren, am Ende die Spießform tragend, zu langen Ketten aneinandergereiht. Im Tuscheausstrich erkannte Gins jedoch, daß das, was zuerst als Kettenform imponiert hatte, tatsächlich durch Drehung der bandförmigen Fäden entstanden war.

Die Mikroorganismen erwiesen sich als gramlabil, besonders ältere Kulturen neigten mehr nach der gramnegativen Seite hin.

4. Landau ist es bereits 1916 gelungen, aus normalen Zahnbelägen leptothrixartige Mikroorganismen zu isolieren. Er fand zunächst Bakterien, die echten Di-Bazillen in Form, Größe und Lagerung, sowie Polkörperchenfärbung durchaus glichen. Da-

neben sah er aber auch stets Stäbchen, die wesentlich größer als Di-Bazillen waren und zu langen Fäden auswuchsen. Auf Löffler-Serum zeigten sie aber schlechtes Wachstum und bildeten grünliche Kolonien. Auf Drigalski- und Endo-Agar wuchsen sie rot. In neutraler Bouillon bildeten sie keine Säure. Ein angesetzter Tierversuch blieb ohne jeden Erfolg.

Bei wiederholtem Überimpfen konnte Landau mehrfach Umschläge von Di-ähnlichen Stäbchen zu langen unverzweigten Fäden finden. Ebenso fanden sich umgekehrt Umschläge von langen Fäden zu kurzen Stäbchen. Bei längerem Suchen fanden sich in jeder Kolonie die verschiedensten Formen nebeneinander. Die Befunde führten Landau zu der Ansicht, daß Faden- und Bazillenform zu dem selben Formenkreis gehörten und daß es sich um eine Leptrothrixart handele. Die von v. Miller als charakteristisch angesehene Violettfärbung durch Lugolsche Lösung ließ sich nicht bestätigen, da morphologisch völlig gleiche Individuen sich dem Farbstoff gegenüber völlig verschieden verhielten.

Die Fadenbakterien waren unbeweglich und gramlabil mehr nach der negativen Seite hin.

3. Pathogenität.

Die im Schrifttum niedergelegten Untersuchungen lehren, daß das Leben der Leptotricheen auf den menschlichen Körper beschränkt ist. Außerhalb des Körpers kommen sie, wie übrigens auch die anderen anaeroben Bewohner der Mundhöhle, nicht vor; jedenfalls ist ihr Vorhandensein praktisch bedeutungslos. Die allmählich beginnende Besiedlung des kindlichen Mundes mit diesen Mikroorganismen kommt, wie Gins, Brailowsky u. a. nachweisen konnten, nicht durch Einwanderung aus der Außenwelt mit der aufgenommenen Nahrung usw. zustande, sondern durch unmittelbare Übertragung aus der Mundhöhle Erwachsener. Es handelt sich also um einen regelrechten Infektionsvorgang.

Inwieweit nun diese durch Infektion in den menschlichen Körper gelangten Mikroben zu krankhaften Veränderungen des Organismus Veranlassung geben oder in irgendeiner Beziehung zu ihnen stehen, sollen die Krankheitszustände beleuchten, bei denen Leptothrix gefunden worden ist. Die hier zusammengetragenen Fälle sind, dem spärlichen Schrifttum entsprechend, nur sehr wenige und klinisch ohne große Bedeutung. Sie setzen sich in der Hauptsache aus Erkrankungen der Mundhöhle und ihrer näheren Umgebung zusammen.

Es wurden Leptothrix gefunden und isoliert bei:

1. Angina leptothrica,
2. Mykosen des Pharynx und der Zunge,
3. Zahnkaries,
4. Alveolarpyorrhoe,
5. Pleuritis,
6. einem Fall von Leberinfarcierung bei kallösem Ulcus duodeni,
7. Pyelitis cystica,
8. Scheidenmykosen,
9. Parinaudscher Konjunctivitis.

1. Fürbringer hat einen, Joseph 2 Fälle von seit längerer Zeit bestehender hartnäckiger Angina mitgeteilt, die jedoch keine besondere Störung des Allgemeinbefindens zur Folge hatten. Es fanden sich auf den Tonsillen festhaftende gelbliche, stippchenförmige Beläge, die jedesmal Reinkulturen von Leptothrix buccalis enthielten. In dem einen Falle wurde von Joseph der Versuch einer Züchtung auf Fleischbrüh- und Maltose-Agar unternommen, der jedoch zu keinem Ergebnis führte.

2. Arustamow, Roedetius und Brack, Chiari sowie Fränkel beschreiben eine Anzahl von Mykosen der Rachenhinterwand und der Zunge. Meistens fanden sich in der Umgebung des Zungengrundes und an den Tonsillen weißliche, erhabene Flecken, die Reinkulturen von Leptothrix darstellten. In dem von Roedetius und Brack mitgeteilten Falle war eine spindelförmige Nekrose des Zungengrundes zu sehen. Alle diese Mykosen verliefen ohne Störung des Allgemeinbefindens, ohne Fieber und gingen nach Pinselungen mit antiparasitären Mitteln, wie Pyoktanin usw., schnell zurück. Ein positives Züchtungsergebnis war nur Arustamow beschieden.

3. Ein äußerst interessantes und vielleicht epochemachendes Ergebnis hat Gins in seinen auf gründlichen Vorarbeiten beruhenden Untersuchungen über den bakteriellen Anteil der kariösen Zerstörung der Zähne einer größeren Öffentlichkeit zur Kenntnis gebracht. Gins hat seit Jahren an der Züchtung der im kariösen Detritus feststellbaren Bakterien gearbeitet. Es ist ihm dabei mit der Methode Fortners gelungen, die das Bild beherrschenden Bakterien zu züchten und als Leptotricheen zu identifizieren. Weiterhin fanden sich noch: Bact. fusiforme, Aktinomyces, Spirillen und Vibrionen.

Auf die Feststellungen, daß die von ihm gefundenen Leptotricheen streng anaerob gedeihen und außerhalb der menschlichen Mundhöhle keine Lebensmöglichkeit haben, baute Gins seine

Versuche in der Weise auf, daß kariöse Milchzähne sofort nach der Extraktion mit steriler NaCl-Lösung abgespült und in mit sterilem Wasser angefeuchteten Seesand gebettet wurden. Danach wurden sie unter streng anaeroben Bedingungen 1 Jahr lang im Brutschrank aufbewahrt. Um die Austrocknung zu verhindern, wurde stets zu gegebener Zeit neues steriles Wasser zugegossen.

Die Ergebnisse waren folgende:

1. In den steril aufbewahrten und von allen anhaftenden Nahrungsresten und Gewebsteilen befreiten Zähnen ging die kariöse Zerstörung weiter.
2. Es bildeten sich neue kariöse Stellen unabhängig von den bestehenden.
3. In gleichzeitig mit den kariösen Zähnen unter gleichen Bedingungen bebrüteten Zähnen, die bei der Extraktion vollkommen gesund waren, ließ sich keine Karies feststellen.

Diese Befunde haben Gins den Schluß ziehen lassen, daß die Zahnkaries auf Grund einer regelrechten Infektion mit Leptothrix zustande kommt, die natürlich den gleichen biologischen Gesetzen wie die anderen Infektionskrankheiten unterliegt, eine gewisse Disposition des Zahnmaterials zur Voraussetzung hat und in ihrer Pathogenese von der jeweiligen Abwehrkraft des Organismus sehr stark beeinflußt wird.

4. Mendel berichtet von einer Alveolarpyorrhoe, bei der sich massenhaft gramnegative, rosettenförmig angeordnete Haufen von Fadenbakterien fanden. Diese wuchsen anaerob auf Serum- und Ascites-Agar. Die Fäden hatten eine Dicke von 0,4 my und eine Länge von 30—50 my, zeigten keinerlei Verzweigungen und ergaben bei Verimpfung auf Meerschweinchen ein ausgedehntes Ödem und Lymphdrüsenschwellung. Wegen der rosettenförmigen Anordnung nannte sie Mendel „L. astéroide".

5. Galli-Valerio und Bornaud fanden in einem eitrigen Pleurapunktat Knäuel von 20—30 μ langen Fäden, die unverzweigt waren, nicht säurefest und sich nach Gram sowie mit Fuchsin gut färbten.

Züchtungen auf Kartoffeln, Tarozzi-Bouillon, gewöhnlicher Bouillon und Rinderserum hatten Erfolg. Intrapleurale Verimpfung auf Meerschweinchen ließ die Tiere nach wenigen Tagen an respiratorischen Störungen zugrunde gehen. Das mikroskopische Bild und die pathologischen Erscheinungen ergaben eine weitgehende Übereinstimmung der Mikroben mit dem von Rivolta-Piana und Galli-Valerio als L. pleuriticus beim Hunde beschriebenen Bakterium.

6. Lang beschreibt einen Sektionsfall, bei dem weitgehende Infarkte der Leber von einem nahe gelegenen kallösen Ulcus duodeni ausgingen. Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine dichte Durchwachsung des Lebergewebes mit fadenförmigen, unverzweigten Mikroorganismen, die eine stark nekrotisierende Wirkung auf das umgebende Lebergewebe ausgeübt hatten. Das Bakterium wurde als Leptothrix angesprochen, ein Züchtungsversuch jedoch nicht angestellt.

7. Im Harn eines Tabikers fand Arustamow und in einem Nierenbecken bei Pyelitis cystika F. E. Koch, bei einer Mykose der Scheide v. Herff Leptothrixfäden, eine Züchtung und Reinkultur gelang Koch und Arustamow.

8. Bei echter Parinaudscher Konjunctivitis stellte Verhoeff in den Schnittpräparaten bei 11 Fällen 3—10 μ lange Fäden von 0,3 μ Dicke fest, die unverzweigt und stellenweise mit Körnchen besetzt waren. Er rechnete die gefundenen Mikroorganismen zu den Leptotricheen, eine Züchtung wurde nicht versucht.

In Zusammenhang mit den hier angeführten krankhaften Erscheinungen, bei denen Leptothrix teils in mittelbare, teils in unmittelbare ursächliche Beziehung zu der Erkrankung gebracht wurde, muß noch erwähnt werden, daß Leptothrix regelmäßig bei Noma in dem geschädigten Gewebe und in den sogenannten Dittrichschen Pröpfen bei Bronchiektasen zu finden ist (vgl. Huntemüller!).

Zusammenfassend kann über die Merkmale der Leptotricheen folgendes gesagt werden:

Es handelt sich um gramlabile, unbewegliche und unverzweigte Fäden, die eine erhebliche Länge erreichen können (bis 80 μ). Dagegen ist ihr Durchmesser gering (0,5—0,6 μ). Ein ebenfalls von fast allen Autoren bestätigtes Merkmal der Leptotricheen ist die ungeheure Variabilität ihrer Formen.

Aus dieser Tatsache heraus mag sich vielleicht erklären lassen, warum die Meinungen der verschiedenen Forscher zum Teil so stark voneinander abweichen. Neben der als Grundform angesehenen Fadenbildung werden beinahe alle Größen und Formen der Bakterienwelt angegeben. So spricht Landau z. B. von Diähnlichen, Gins von fusiformen-ähnlichen und Mendel von rosetten-förmigen Haufen kurzer, dicker Stäbchen. Alle diese Formen wurden in den gleichen Reinkulturen neben langen Fäden gefunden oder zeigten sich nach Überimpfung in aufeinanderfolgendem Generationswechsel. Die Mannigfaltigkeit schließt von vornherein eine Unterteilung in bestimmte Arten mit konstanter Form aus, wie sie v. Miller glaubte aufstellen zu können.

Die Züchtung gelang meist anaerob auf Agar- oder Blutagarplatten wie auch in flüssigen Nährmedien. Die Kolonien waren sehr klein und zeigten geringes Wachstum und geringe Lebensdauer.

In Bezug auf die Pathogenität und die klinische Bedeutung kann aus den erwähnten Arbeiten folgender Schluß gezogen werden:

Im Großen und Ganzen ist die klinische Bedeutung der Leptotricheen gering; ihre Anwesenheit kann aber gelegentlich zu Mykosen und Anginen Anlaß geben. Bei der Entstehung der Zahnkaries ist ihre Rolle noch nicht restlos geklärt; möglicherweise kommt den Feststellungen von Gins ernsthafte Bedeutung zu. Die Fälle, bei denen L. im Exsudat bei Pleuritis exsudativa, im Eiter bei Alveolarpyorrhoe sowie in infarciertem Lebergewebe gefunden wurde, haben Seltenheitswert. Bei Parinaudscher Konjunctivitis scheint der Befund regelmäßiger zu sein. Zusammenfassend darf festgestellt werden, daß die Leptotricheen und die durch sie hervorgerufenen Erkrankungen noch zahlreiche Fragen offen lassen. Zu ihrer Klärung beizutragen, mögen die vorliegenden Untersuchungen dienen.

B. Eigene Ergebnisse.

1. Untersuchungsmaterial.

Das zu den vorliegenden Untersuchungen benutzte Material stammt aus den Abstrichen, die täglich in der Zeit von Oktober bis Dezember 1937 dem Hygienischen Institut der Universität Breslau zur Untersuchung auf Diphtheriebazillen eingeliefert wurden. Die gefärbten Originalpräparate hatten gezeigt, daß bei einer großen Anzahl neben anderen Keimen massenhaft Leptothrixfäden zu finden waren. Es wurde nun der Versuch unternommen, aus diesen Abstrichtupfern Letothrix reinzuzüchten und die so gewonnenen Stämme einer weiteren Prüfung zu unterziehen.

Zu diesem Zwecke wurden die Tupfer auf Blutagarplatten ausgestrichen und aerob sowie anaerob bei 37° bebrütet. Der Blutagar bestand aus einem 2,5%igen Fleischwasser-Peptonagar (PH 7,2) mit einem Zusatz von 5% defibriniertem Hammelblut.

Nach längerem vergeblichen Bemühen gelang es endlich, auf einem schwach sauren Agar von 6,5 PH und unter Anwendung anaerober Bedingungen nach der Methode von F. E. Koch die ersten Leptothrixfäden zu züchten.

Die Mikroorganismen wuchsen in winzig kleinen, etwa stecknadelkopfgroßen Kolonien, die farblos durchscheinend waren.

Mikroskopisch zeigten sich lange, schmale, teilweise leicht gekrümmte und unverzweigte Fäden von etwa 0,5 μ Dicke und 50—80 μ Länge. Sie waren unbeweglich, gramlabil und färbten sich gut mit Methylenblau, Kristallviolett und Fuchsin.

Die Züchtung und Isolierung war mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Die Winzigkeit der Leptothrixkolonien brachte es mit sich, daß sie von den zwangsläufig mit ausgestrichenen Begleitkeimen häufig vollkommen überwuchert wurden. Wichtiger war die Erkenntnis, daß, wie eine Kontrolle der Abnahmedaten ergab, eine Züchtung nur dann gelang, wenn die Tupfer noch am Tage der Abnahme vom Patienten ausgestrichen werden konnten. Bei längerem Stehen verloren die Leptothrixfäden, wohl infolge der Austrocknung, ihre Lebensfähigkeit. Da aus äußeren Gründen die Tupfer erst zur Anfertigung eines Originalpräparates auf einen Objektträger, sodann zur Untersuchung auf Di-Bazillen auf Clauberg-Nährboden ausgestrichen werden mußten und erst dann zur Züchtung der Leptothrix zur Verfügung standen, war die Aussicht, noch genügend Material zu erhalten, verhältnismäßig gering.

Es wurden auf diese Weise 3000 Tupfer untersucht, bei denen 124mal Leptothrixfäden gefunden wurden; in 18 Fällen konnten sie reingezüchtet werden.

18 Stämme standen somit der weiteren Untersuchung zur Verfügung.

Wie sich bei der Reinzüchtung gezeigt hatte, war

1. ein völliger Sauerstoffabschluß nötig,
2. gelang die Züchtung nur bei Einstellung des Agar auf ein PH von 6,5.

Es ergab sich aus dieser Tatsache die Frage:

a) Welche Rolle spielt die Wasserstoffjonenkonzentration bei der Kultur der Leptotricheen?

b) Ist ein Wachstum auch bei nicht anaeroben Bedingungen möglich?

Die große Variabilität der Form der Leptotricheen, auf die immer wieder hingewiesen worden ist, machte weiterhin morphologische Untersuchungen notwendig. Ebenso mußte die Form der Kolonien und das Wachstum unter den verschiedensten Bedingungen und Nährböden einer Prüfung unterzogen werden. Schließlich harrte noch die Frage des Verhaltens der Reinkulturen im tierischen Organismus der Beantwortung.

2. Versuchsanordnung.

I. Kulturelles Verhalten.

a) Prüfung des Wachstums auf Nährböden verschiedener Wasserstoffjonenkonzentration unter
   1. aeroben Bedingungen,
   2. anaeroben Bedingungen,
   3. verminderter Sauerstoffspannung.

b) Kulturen auf:
   1. Fleischwasser-Pepton-Agar,
   2. Hammelblutagar,
   3. Ascitesagar,
   4. Löfflerserum,
   5. Clauberg-Nährböden,
   6. Schrägagarröhrchen,
   7. Agarstichkulturen,
   8. gewöhnlicher Nährbouillon,
   9. Traubenzuckerbouillon,
   10. Tarozzi-Bouilllon.

II. Morphologisches Verhalten.

a) Laufende Anfertigung von Präparaten der verschiedenen Kulturen und Kontrolle des morphologischen Bildes in einem Zeitraum von durchschnittlich 4 Monaten bei wöchentlichem Generationswechsel.

b) Tierpassagen.
   1. Verhalten der Form während und nach Tierpassagen.
   2. Untersuchungen über die Lebensdauer im tierischen Organismus.

III. Färberisches Verhalten.

IV. Serologisches Verhalten.

a) Versuch der Herstellung eines spezifischen Antiserums,

b) Feststellung des Agglutinationstiters und Agglutination der gezüchteten Stämme zum Zwecke der Identifizierung.

V. Tierpathogenität

a) bei Mäusen,

b) bei Meerschweinchen.

I. Kulturelles Verhalten.

a) Zur Untersuchung des Wachstums auf Nährböden von verschiedener H-Jonenkonzentration diente ein 2,5% iger Fleischwasser-Peptonagar ohne jeglichen Zusatz.

Mit Hilfe des Elektrojonometers wurden Nährböden mit den PH-Werten 8,5, 7,5, 6,5 und 5,5 hergestellt und zu Platten ausgegossen.

Daraufhin erfolgte die Beimpfung der Nährböden mit den 18 Versuchsstämmen in folgender Weise:

1. Von jedem Stamm wurden je 3 Kulturen auf Agar von 8,5, 7,5, 6,5 und 5,5 PH angelegt,
2. die von jedem Stamme so hergestellten 12 Kulturen wurden nun unter:
   a) aeroben Bedingungen,
   b) anaeroben Bedingungen,
   c) verminderter Sauerstoffspannung
   2 mal 24 Std. bei 37° bebrütet.

Zur Herstellung anaerober Verhältnisse wurde die Methode von F. E. Koch benutzt, die mit Hilfe von in Fließpapiertäschchen eingeschüttetem Pyrogallol, Kieselgur und Pottasche unter luftdichtem Abschluß durch Plastilin nahezu sauerstofffreie Verhältnisse schafft.

Zur Gewinnung der verminderten Sauerstoffspannung diente die Methode nach Bachmann. Die Nährbodenschalen wurden nach Beimpfung auf vorher erwärmte Glasplatten aufgelegt und mit diesen durch eine Plastilinabdichtung luftdicht verbunden.

Es erfolgte nun eine Kontrolle der Kulturen nach 24 und 48 Stunden. Das Ergebnis ist in den nachstehenden Tabellen I, II und III ersichtlich.

Die Kulturversuche auf den Agar von 8,5 PH blieben, wie auf Tabelle I bemerkt, ergebnislos. Die übrigen Kulturen zeigten nach 24 Stunden kleinste, stecknadelspitzengroße Kolonien in lichter Anordnung.

Am stärksten und dichtesten waren die Kolonien auf dem Agar von 6,5 PH und hierbei wieder die anaeroben Kulturen. Nach 24 Stunden wuchsen sie zu einem dichten, feuchten, in der Durchsicht milchig schimmernden Rasen aus.

Nach 14 Tagen erreichten Einzelkolonien die Höchstgrenze von 1—2 mm. Diese Einzelkolonien zeigten bei der Betrachtung mit der Lupe in der Mitte eine erhabene Spitze. Nach dem Rande zu hatten sie eine kreisrunde, terrassenartige Begrenzung, die von einem ausgefransten Rand wurzelartiger Ausläufer umgeben war.

Die Kolonien ließen sich leicht vom Nährboden abstreichen und bildeten dabei eine schleimige, milchige Masse.

Während die Erstzüchtung nur auf Nährböden von einer PH 6,5 gelungen war, ergab sich eine Verbreiterung der Vegetationsmöglichkeiten bei der Weiterzüchtung.

Die Tabellen I, II und III zeigen, daß das Optimum des Wachstums bei vollkommen anaeroben Bedingungen und einer Wasserstoffjonenkonzentration von 6,5 PH zu liegen scheint.

Deutlich treten diese Unterschiede in den Wachstumsbedingungen aber nur bei den 24 stündlichen Kulturen zutage. Nach 48 Stunden ist das Wachstum bei den mit verminderter Sauerstoffspannung angelegten Kulturen dem Wachstum der anaeroben Kulturen annähernd angeglichen.

Bei den aeroben Kulturen war nach 24 Stunden das Wachstum auf allen Agarsorten gleich schwach. Nach 48 Stunden besaßen aber die Kulturen auf dem Agar von 6,5 PH einen deutlichen Vorsprung.

Graphisch ist das Ergebnis des Versuches in der Tabelle IV dargestellt.

Tabelle I.

Auf dem **7,5** wertigen Agar zeigten die Stämme folgendes Wachstum:

24 Std.			48 Std.			
aerob	anaerob	Bachmann	aerob	anaerob	Bachmann	Stamm
†	††	†	†	†††	†††	145
†o	††	††	†	†††	†††	784
†	†	†	†	†††	††	Ho
†	†	†o	†	†††	††	293
†	†	†o	††	†††	†††	225
††	†	††	††	†††	†††	400
††	††	††	††	†††	†††	214
†	†	†	†	††	††	929
†	†	†	†	††	†	220
†	†	††	†	†	††	911
†	†	†o	†	††	†	807
†	†	†o	†	††	††	809
††	†	†o	†	†††	†	810
†o	†	†	††	††	†	v.B.
††	†	††	††	††	†††	385
††	†	†	††	†††	††	942
†	†o	†	†	†††	††	mM
†	†o	†	†	††	†††	Hein

Es bedeutet:

†o = sehr schwaches Wachstum,
† = schwaches Wachstum,
†† = gutes Wachstum,
††† = sehr gutes Wachstum,
o = kein Wachstum.

Auf dem Agar von 8,5 PH war überhaupt kein Wachstum eingetreten.

Tabelle II.

Auf dem **6,5** pH-wertigen Agar:

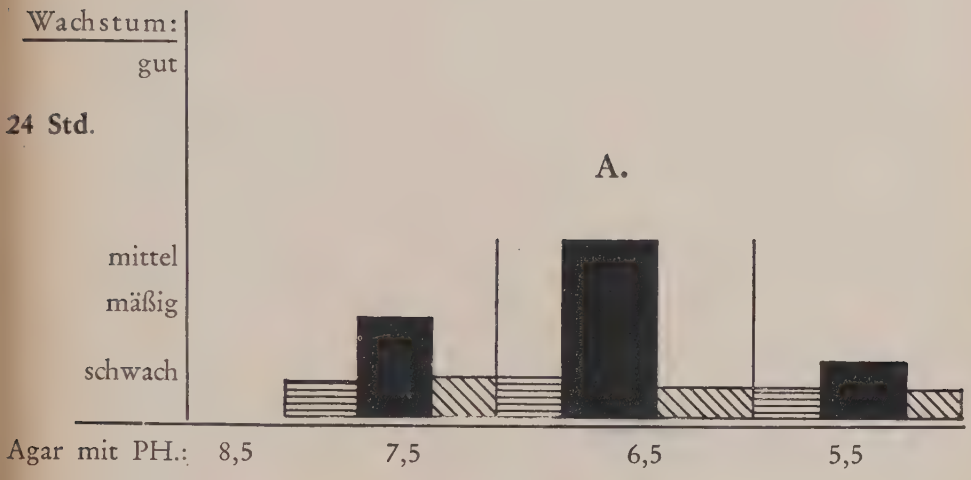
24 Std.			48 Std.			
aerob	anaerob	Bachmann	aerob	anaerob	Bachmann	Stamm
†	†	†	††	†††	††	145
†	††	†	††	†††	††	784
†	††	†	††	†††	††	Ho
†o	††	†o	†	†††	††	393
†	††	†	††	†††	††	225
†	†††	†o	††	†††	††	400
†	††	†	††	††	††	214
†	†††	†	††	†††	††	929
†	††	†	††	†††	††	220
†	††	†	††	††	††	911
†	†o	†o	††	†	††	807
†	†††	†	††	†††	††	809
†	††	†	††	††	††	801
†	††	†	††	†††	††	v.B.
†o	††	o	†o	†††	o	385
†	†††	†	†	†††	††	942
†	††	†	††	††	††	M
†	††	†o	†	†††	††	Hein

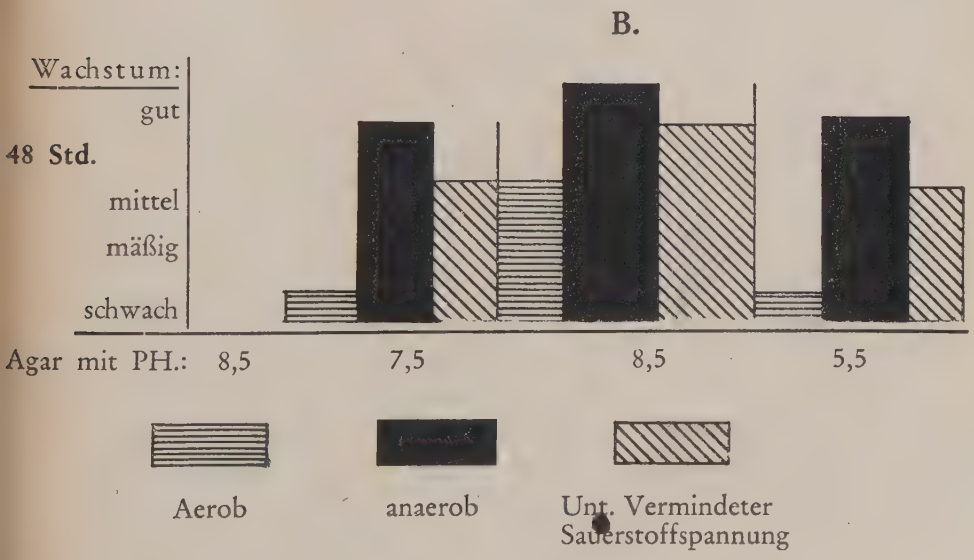
Tabelle III.

Auf dem **5,5** pH-wertigen Agar:

24 Std.			48 Std.			
aerob	anaerob	Bachmann	aerob	anaerob	Bachmann	Stamm
†	†o	†	†	†††	††	1455
†o	†o	††	†	††	††	784
†	†	††	†	†††	††	Ho
†o	†	†	†	†††	††	393
†o	†o	†	†o	†††	††	225
†o	†	†	†o	†††	††	400
†o	†	††	†	†††	††	214
†o	††	††	†	††	††	929
†o	††	††	†	††	††	220
†	†	††	†	†††	††	911
†	††	††	††	†††	††	807
†	††	††	†	††	††	809
†o	†	††	†o	††	††	810
†	†o	††	†	†††	††	v.B.
o	o	o	†o	o	o	385
†o	††	††	†	†††	††	942
†o	†	††	†	†††	††	mM
†	†o	†	†	†††	††	Hein

Tabelle IV.





Aerob anaerob Unt. Vermindeter Sauerstoffspannung

Der Versuch lehrt Folgendes:

Die besten Bedingungen für das Wachstum der Leptotricheen bietet ohne Zweifel das schwachsaure Milieu. Im stark alkalischen Medium war überhaupt kein Leben mehr möglich. Das Wachstum im neutralen Milieu (7,5) und im stärker sauren (5,5) ist etwa gleichstark, tritt aber im Verhältnis zu dem im schwach sauren langsamer ein. Diese Tatsache ist besonders für Erst- und Reinzüchtungen von Bedeutung. Durch das langsamere Wachstum der Leptotricheen auf dem Agar von neutralem Milieu entsteht nämlich für die übrigen mitausgestrichenen Keime ein erheblicher Vorsprung. Sie überwuchern die winzigen Kolonien des Leptothrix vollkommen, so daß der Eindruck entstehen muß, daß auf dem Agar von 7,5 PH, der zuerst zur Züchtung benutzt wurde, kein Wachstum möglich ist.

Was die Rolle des Sauerstoffs anbelangt, so berechtigt das Ergebnis des Versuchs zu der Feststellung, daß es sich bei den Leptotricheen zwar nicht um obligate, wohl aber um fakultative Anaerobier handelt.

Auch unter aeroben Bedingungen trat ein, wenn auch wesentlich geringeres Wachstum auf. Man muß wohl gewisse Anpassungserscheinungen annehmen, da Erstzüchtungen stets nur unter anaeroben Bedingungen gelangen.

b) Nach dieser Feststellung über die Rolle der H-Jonenkonzentration und die des Sauerstoffs bei der Kultur wurden noch eine Reihe anderer Nährböden zur Prüfung herangezogen. Die Kulturen auf festen Nährböden wurden anaerob nach der Methode Kochs angelegt. Die Agarstichkulturen und Kulturen in flüssigen Nährböden unter aeroben Bedingungen bebrütet.

1. Da das Verhalten auf Fleischwasserpeptonagar bereits geschildert ist, werden die Nährböden in der früher angegebenen Reihenfolge aufgeführt werden.

2. Auf Hammelblut-agar, der auch zur Erstzüchtung benutzt wurde, wuchs nach 24 Stunden ein schwacher, farbloser, feuchtglänzender Rasen im Verlaufe des Impfstriches. Einzelkolonien waren etwa stecknadelspitzengroß und von kreisrunder Form. Nach 48 Stunden schimmerten die Kolonien schwach grau und waren zum Teil etwas größer als ein Stecknadelkopf. Der Rasen war wesentlich dichter und stärker. An den Rändern konnte man wurzelartige Ausläufer beobachten. Der ursprünglich hellrote Nährboden war in der Nähe der Impfstriche stark verändert und zeigte eine gelblich-braune Farbe. Strich man die Kolonien ab, so blieb an der Stelle deutlich ein heller Hof zurück. Auch sah man, daß der Nährboden an dieser Stelle leicht eingesunken war.

Ältere Kolonien strömten den von Gins beschriebenen säuerlichen Geruch aus.

Die Lebensdauer war auf etwa eine Woche beschränkt, spätere Überimpfungen blieben stets erfolglos.

3. Auf Ascites-Agar war ein gutes Wachstum zu beobachten. Auch hier bildete sich ein dichter Rasen, der in der Durchsicht völlig farblos erschien und an dichteren Stellen milchig-bläulich schimmerte.

4. Auf Löffler-Serum wuchsen die Stämme außerordentlich schnell und kräftig. Bereits nach 24 Stunden erschienen auf den Platten kleine, farblose, feuchtglänzende Kolonien in Stecknadelkopfgröße. Nach 36 Stunden waren sie zu einem dichten Rasen ausgewachsen, der in der Aufsicht völlig farblos erschien und beim Zusammenstreifen eine milchig-weißliche Masse ergab. Die Konsistenz war schleimig-feucht. Der Nährboden wies keinerlei Veränderung auf, die Kolonien waren in den Nährboden nicht eingedrungen; eine peptonisierende Wirkung war also nicht vorhanden. Einzelkolonien waren gleichmäßig rund und 2—3 mm groß. Der üppig gewachsene Rasen zeigte eine scharf abgegrenzte Kante, von der eine spiegelglatte Fläche allmählich nach dem Rande zu abfiel, so daß das ganze in der Form etwa einem Tafelberge vergleichbar war.

5. Auf Clauberg-Nährböden wuchsen auch bei dichtester Beimpfung nur sehr wenige kleine Einzelkolonien von runder Form und schwarzer Farbe. Das Wachstum trat aber erst nach 4 tägigem Aufenthalt im Brutraum auf.

6. Auf Schrägagar wuchsen die Stämme zwar verhältnismäßig schwach und langsam, behielten aber infolge der geringen Austrocknung ziemlich lange ihre Lebensfähigkeit. Noch nach 3 Wochen konnten sie mit Erfolg neu überimpft werden. Nach 24 Stunden zeigten sich dabei winzigste, mit dem bloßen Auge kaum sichtbare Kolonien von der Form eines Spitzkegels, die im durchscheinenden Licht als bläulich-weißer Hauch imponierten.

Nach 36 Stunden waren diese Kolonien zu einem schwachen, milchigen Rasen ausgewachsen. Einzelkolonien hatten die Größe eines Stecknadelkopfes erreicht.

7. Agar-Stich-Kulturen zeigten nach 36 Stunden zu beiden Seiten des Stiches in einer Ebene liegende, schmale, bandartige Streifen, an denen zuweilen symmetrisch angelegte, halbmondförmige Ausbuchtungen zutage traten. Der ganze Stich erschien etwa wie ein gewelltes Band von milchiger Farbe mit einer schwachen Granulierung. Zum Teil waren auch dünne Ausläufer zu beobachten, die am Ende ein weißliches Köpfchen trugen.

8. Gewöhnliche Nährbouillon blieb steril; auch nach 14 tägiger Bebrütung war kein Wachstum festzustellen.

9. Traubenzucker-Bouillon hingegen bildete einen guten Nährboden. Bereits nach 24 Stunden zeigten 10 der Röhrchen, die mit den 18 Stämmen beschickt waren, diffuse Trübung, bei 5 hatte sich ein weißlicher Bodensatz gebildet und nur 3 blieben klar.

10. Tarozzi-Bouillon zeigte nur geringe Veränderungen. Erst nach 8 Tagen machte sich eine schwache Trübung bemerkbar. Jedoch fand keine Schwärzung der Organstückchen statt.

II. Morphologisches Verhalten.

a) Hatte Mendel rosettenförmig angeordnete Fäden, Gins fusiformen-ähnliche und Landau an Diphtheriebazillen erinnernde Stäbchen gefunden, so gab die hier zutage tretende Variabilität des morphologischen Bildes Veranlassung, an Hand von laufend angefertigten Präparaten Vergleiche zu ziehen.

So wurden von 9 Stämmen mit Beginn der Reinzüchtung bis zum Abschluß der Untersuchungen bei jeder Überimpfung auf einen neuen Nährboden ein Präparat angefertigt und aufbewahrt. Auf diese Weise wurde jeder Stamm etwa 4 Monate lang beobachtet und dabei in jeder Woche durchschnittlich 1 Präparat hergestellt.

So konnte an Hand von etwa 20 Präparaten je Stamm der Wechsel der Formen leicht verfolgt und belegt werden.

Es zeigte sich dabei folgendes:

Bei der Erstzüchtung wurden bei allen Stämmen zunächst lange, unverzweigte, völlig homogene Fäden gefunden, die eine Breite von etwa 0,5 μ hatten und zu einer Länge von 50 bis 80 μ auswuchsen.

Bereits in den nächsten Generationen traten dann neben der Fadenform massenhaft kurze und längere Stäbchen auf, die zum Teil einzeln lagen oder in 2- und 3-gliedrigen Ketten vereint waren.

Je älter die Kulturen wurden, um so dünner wurden die Fäden und Stäbchen. Die Fadenform trat immer mehr zugunsten der Stäbchenform zurück. Bei längerem Suchen konnte man aber auch hier noch Fäden finden, die starke Teilungserscheinungen zeigten, so daß das Ganze mehr an eine Stäbchenkette erinnerte. In manchen älteren Generationen fanden sich nur noch kurze, dünne Stäbchen, die in ihrer Lagerung und Größe fast mit Di-Bazillen vergleichbar waren. Das entspricht ganz dem Bild, das Landau in seiner Arbeit beschrieben hatte. Die Mikro-

organismen waren von ihrer ursprünglichen Fadenform derart abgewichen, daß ein ungeübter Beobachter sie niemals als Leptothrix angesprochen hätte. Daß hier aber keine Verunreinigung vorlag, bewiesen Züchtungen nach Tierpassagen, bei denen die lange Fadenform wieder klar zutage trat.

Schlagartig änderte sich meist auch das Bild, wenn eine Nährbodenänderung vorgenommen wurde.

Überimpfen von Hammelblutagar auf Löfflerserum z. B. ergab einen erstaunlich schnellen Umschlag von dünnen, kurzen Stäbchen zu sehr kräftigen langen Fäden. Sobald aber der Nährboden in den nächstfolgenden Generationen weiter benutzt wurde, wuchsen bald wieder kleine dünne Stäbchen.

Eine eigenartige Formveränderung konnte auf 4 Wochen alten Schrägagarkulturen beobachtet werden.

Neben gleichmäßigen, dünnen Fäden zeigten sich verschiedene Fäden mit kugelrunden, dicken Ausbuchtungen des Zellinhalts, die sich stärker färbten als die Fäden selbst. Es entstand etwa die Form einer Perlenkette mit ungleichmäßig aufgereihten Perlen verschiedener Größe.

Die Kulturen, in denen solche Formveränderungen gefunden wurden, ließen sich nicht mehr fortpflanzen. Es kann also angenommen werden, daß es sich hier nicht etwa um eine Sporenbildung, sondern wahrscheinlich um eine Degenerationserscheinung gehandelt hat. Dafür spricht auch, daß derartige Formen niemals in Originalpräparaten gefunden wurden, sondern stets nur in alten Kulturen auf Nährböden geringer Qualität.

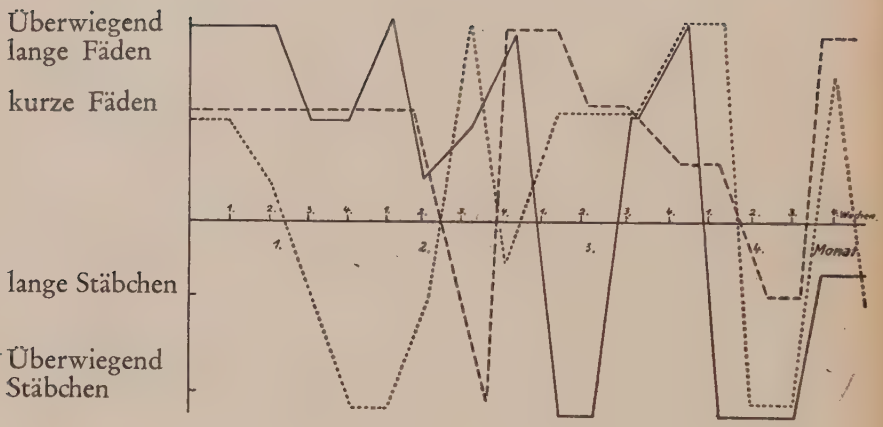
Um den im Verlaufe von 4 Monaten zutage getretenen Formenwechsel deutlich zu machen, ist in Tabelle V eine Kurve von den 3 zuerst gezüchteten Stämmen aufgestellt worden.

Bei Stamm I trat 5 mal, bei Stamm II trat 2 mal, bei Stamm III trat 2 mal ein grundlegender Wechsel von der Stäbchen- zur Fadenform auf. Die häufig auftretenden Mischbilder, in denen sowohl Fäden wie auch Stäbchen zu sehen waren, sind dabei unberücksichtigt geblieben.

Präparate im hängenden Tropfen ließen bei sämtlichen Stämmen niemals Beweglichkeit erkennen. Man sah deutlich, daß die Fäden einen kreisrunden Durchschnitt hatten, also etwa mit einem dünnen Zylinder vergleichbar waren; bei leichtem Hin- und Herbewegen der Mikrometerschraube wurde dies besonders deutlich erkennbar.

b) Zur Prüfung der Frage, wie lange die Lebensdauer der Leptothrix im tierischen Organismus ist und welche Formveränderungen sich nach Tierpassagen zeigen, wurde mit 3 Stämmen folgender Versuch unternommen:

Tabelle V.



Stamm 1 = ·····
„ 2 = – – – –
„ 3 = ———

Kurve des Formenwechsels bei den Stämmen 1, 2 und 3.

Je 6 Tiere erhielten 1 ccm einer dichten Aufschwemmung in NaCl-Lösung intraperitoneal eingeimpft. Ein vorher angefertiges Präparat jeden Stammes diente zur Kontrolle der etwa auftretenden Formveränderungen. Die Tiere wurden dann in folgender Anordnung getötet:

Das	1.	Tier	nach		48	Std.
„	2.	„	„	2 × 48		„
„	3.	„	„	3 × 48		„
„	4.	„	„	4 × 48		„
„	5.	„	„	5 × 48		„
„	6.	„	„	6 × 48		„

Von den getöteten Tieren wurde je ein Originalpräparat aus Milz und Netz angefertigt, sowie eine Blutagarkultur mit Ausstrichen aus den genannten Organen angelegt.

Die Originalpräparate vor Verimpfung auf die Tiere zeigten bei:

Stamm I	Vorwiegend kurze Stäbchen.
Stamm II	Lange, leicht gebogene Fäden.
Stamm III	Vorwiegend kurze Stäbchen, vereinzelt auch Fäden.

Welche Veränderungen im Laufe der Tierpassagen eingetreten sind, zeigt die folgende Übersicht:

Bei Stamm I waren die nach 48 Std. im Netz und in der Milz nachgewiesenen Stäbchen nach Ablauf weiterer 48 Std. in uncharakteristische Granula verwandelt, die sich in der Kultur wieder zu Fäden umbildeten. Fäden und Stäbchen ließen sich auch nach 6 Tagen noch züchten, obschon das mikroskopische Bild zu diesem Zeitpunkt keine geformten Elemente mehr erkennen ließ. Wurde das Tier nach 4 mal 48 Stunden oder später getötet, war weder im Ausstrich noch durch das Kulturverfahren etwas von dem injizierten Stamm nachweisbar.

Bei Stamm II konnten im Originalausstrich vom Netz mit Sicherheit bis zum 4. Tier noch Stäbchen und Granula nachgewiesen werden. In der Kultur wuchsen ebenfalls bis zum 4. Tier lange Fäden. Die übrigen Kulturen blieben steril.

Bei Stamm III waren bis zum 3. Tier im Ausstrich vom Netz noch winzigste Granula zu erkennen. In der Kultur wuchsen aber nur bis zum 2. Tier Fäden und Stäbchen.

Tabelle VI.

		Ausstrich		Kultur	
	Tier	Netz	Milz	Netz	Milz
Stamm I	Tier 1	St	St	F	F
	Tier 2	Gr	Gr	F	F
	Tier 3	—	—	F.St	F
	Tier 4	—	—	—	—
	Tier 5	—	—	—	—
	Tier 6	—	—	—	—
Stamm II	Tier 1	St.Gr	St	F.St	F
	Tier 2	St	—	F	F.St
	Tier 3	St	St	F	F
	Tier 4	Gr	—	F	F
	Tier 5	—	Gr?	—	—
	Tier 6	—	—	—	—
Stamm III	Tier 1	St.Gr	St	F	F
	Tier 2	Gr	Gr	—	F.St
	Tier 3	Gr	—	—	—
	Tier 4	—	—	—	—
	Tier 5	—	—	—	—
	Tier 6	—	—	—	—

Es bedeutet:

F = Fäden
St = Stäbchen
F.St = Fäden und Stäbchen
Gr = Granula
St.Gr = Stäbchen und Granula.

Die Ergebnisse des Versuchs waren also folgende:

1. Im tierischen Organismus zeigten die Stämme Auflösungserscheinungen, deren zeitliches Auftreten unterschiedlich war. Sie ließen sich durchschnittlich bis zum 3. Tier, also bis zum

6. Tage noch als feinste, völlig uncharakteristische Granula nachweisen, um danach völlig zu verschwinden.

2. In den nach den Tierpassagen angefertigten Kulturen wuchsen wieder die typischen langen Fäden.

3. Die Grenze, bis zu der die Wiederzüchtung gelang, betrug im Höchstfalle 8 Tage.

III. Färberisches Verhalten.

Die Mikroorganismen färbten sich leicht mit Methylenblau, Kristallviolett und Fuchsin. Die Färbung nach Gram war uneinheitlich und bei einigen Stämmen mitunter in den verschiedenen Generationen wechselnd. Es blieben 4 Stämme konstant grampositiv, 3 konstant gramnegativ, und die übrigen Stämme zeigten in den einzelnen Generationen ein wechselndes Verhalten; meist waren sie gramlabil. Eine unterschiedliche Färbung der fädigen und der stäbchenförmigen Wuchsform konnte nicht festgestellt werden. Im allgemeinen kann von einer vorwiegenden Neigung zur Gramlabilität gesprochen werden.

Die Färbung nach Ziehl-Neelsen ergab bei sämtlichen Stämmen fehlende Säurefestigkeit. Die von V. Miller angegebene Violettfärbung mit Lugolscher Lösung konnte nicht bestätigt werden.

IV. Serologisches Verhalten.

Da das Schrifttum keine Angaben über das serologische Verhalten der Leptotricheen aufweist, erschien es von Wert, den Versuch zu unternehmen, ein spezifisches Serum zu gewinnen. Es sollte dazu dienen, mit Hilfe der Agglutination die Identität aller gezüchteten Stämme sicherzustellen.

Zu diesem Zwecke wurde ein gesundes Kaninchen in steigenden Dosen mit einer Aufschwemmung eines der gezüchteten Stämme (Stamm 1) geimpft. Begonnen wurde mit einer Menge von 0,25 ccm einer Aufschwemmung von 2 Ösen in 3 ccm NaCl, die in einem Zeitraum von 14 Tagen auf 3,0 ccm einer Aufschwemmung von 8 Ösen in 3 ccm NaCl gesteigert wurde. Nach einer Pause von 14 Tagen erneute Impfung mit 1,0 ccm Aufschwemmung von 5 Ösen in 3 ccm NaCl beginnend, die nach 10 Tagen 2,5 ccm einer Aufschwemmung von 8 Ösen in 3 ccm NaCl erreichte.

Das Kaninchen vertrug die wiederholten Gaben gut und zeigte keine Störung seines Allgemeinzustandes. 3 Tage nach der letzten Impfung wurde durch Herzpunktion eine genügende Menge Blut entnommen und mit dem gewonnenen Serum eine

Probeagglutination bei dem Impfstamm angesetzt, die unmittelbar bis zur Verdünnung 1 : 300 eintrat. Auch die übrigen Stämme erwiesen sich ebenso wie ein Sammlungstamm als agglutinabel. Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch bei allen Stämmen noch mit dem Serum eines unbehandelten Kaninchens, sowie mit NaCl-Lösung angesetzt. Er blieb erwartungsgemäß negativ. Auch eine unspezifische Agglutination anderer Mikroorganismen (Kokken, Proteus, Di usw.) blieb aus. Es ist also gelungen, ein spezifisches Anti-Serum für Leptothrix zu gewinnen. Die gezüchteten Stämme waren miteinander identisch.

V. Tierpathogenität.

Zur Feststellung der Tierpathogenität wurden mit den 18 Stämmen je ein Meerschweinchen und je eine weiße Maus intraperitoneal und subkutan geimpft.

Bei sämtlichen Tieren konnten nach einer Beobachtung von 2 Monaten keinerlei Erscheinungen, die auf eine Pathogenität der gezüchteten Leptotricheen schließen lassen konnten, beobachtet werden. Die Sektion der geimpften Tiere ergab ebenfalls keine pathologischen Reaktionen; sämtliche Organe waren unverändert.

C. Zusammenfassung.

Bei der Untersuchung von 3000 Di-Abstrichen wurden 124 mal Leptothrixfäden gefunden, die eine Züchtung von 18 Stämmen unter anaeroben Bedingungen und unter Verwendung eines schwach sauren Nährbodens ermöglichte.

Die Versuche ergaben:

1. Das schwach saure Milieu bot unter streng anaeroben Bedingungen die besten Lebensmöglichkeiten für die gezüchteten Fadenbakterien. Im alkalischen Milieu war überhaupt kein Leben möglich.

Als gute Nährböden erwiesen sich Hammelblutagar, Löfflerserum, Ascites-agar, Traubenzuckerbouillon; als schlechte Clauberg-Platten, Schrägagar und Tarozzi-Bouillon. In gewöhnlicher Nährbouillon wuchs überhaupt nichts.

Die Kolonien waren bei allen Stämmen zunächst etwa stecknadelspitzgroß und wuchsen bis zu 5 mm Breite aus. An ihren Rändern zeigten sich wurzelartige Ausläufer.

2. Morphologisch war eine große Variabilität festzustellen. Die Mikroorganismen, die zunächst in langen unbeweglichen Fäden von einer Länge von 50—80 μ und einer Dicke von 0,5 μ wuchsen, wurden in späteren Generationen von dünnen kurzen Stäbchen abgelöst. Nach Tierpassagen fanden sich ebenso

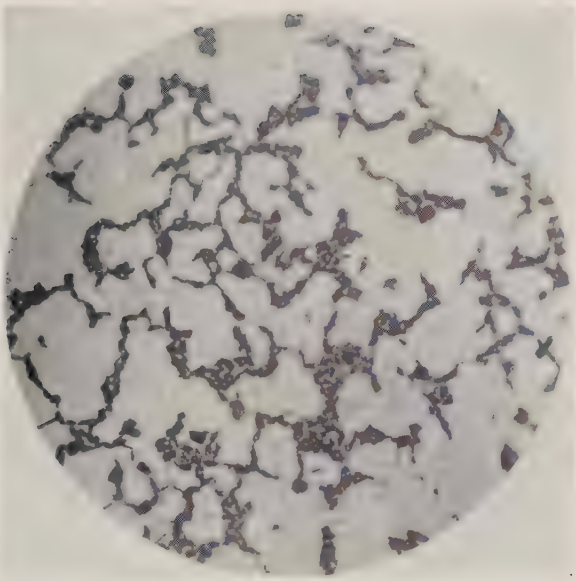


Abb. 1. Kultur von Leptothrix buccalis auf Hammelblut-agar nach 10maligem Generationswechsel. (Stamm I vor Verimpfung.)

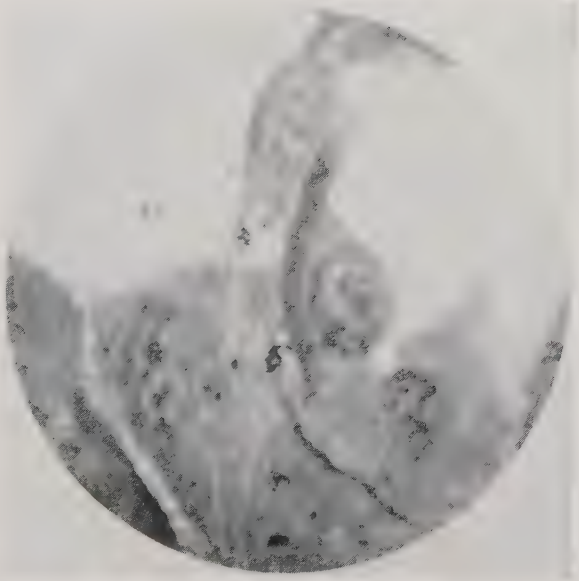


Abb. 2. Originalausstrich aus Milz eines mit Stamm I geimpften Tieres. (Granulabildung.)

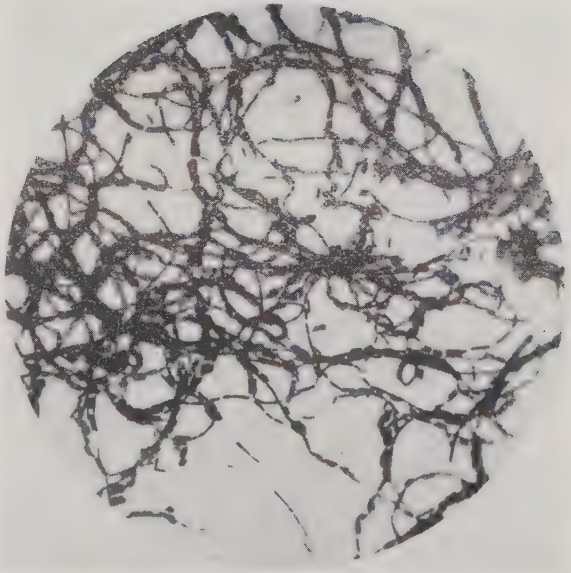


Abb. 3. Reinkultur von Stamm I nach Tierpassage auf Hammelblut-agar. (Kultur aus Milz.)

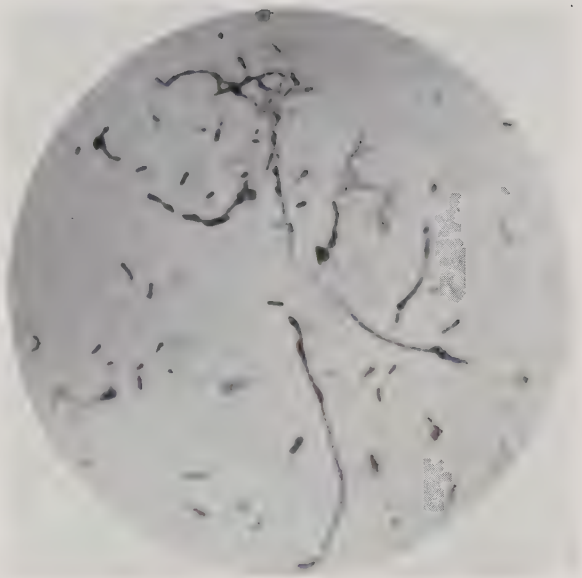


Abb. 4. Reinkultur von Leptothrix bucc. auf Hammelblut-agar nach 8maligem Generationswechsel. (Stamm III vor Verimpfung.)

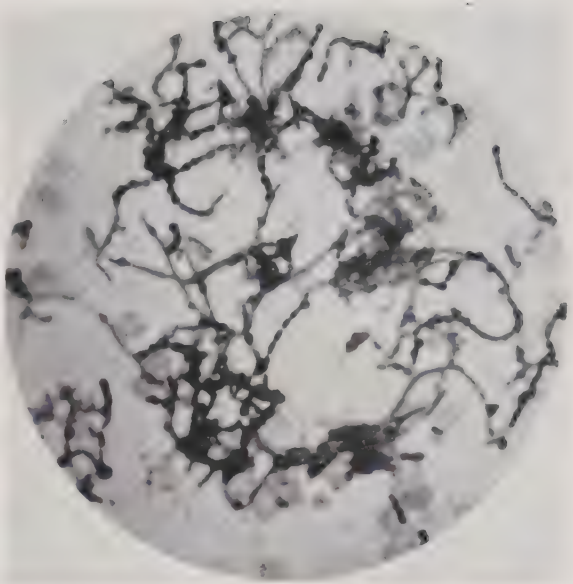


Abb. 5. Reinkultur von Leptothrix bucc. auf Schrägagar, 4 Wochen alt. (Degenerationserscheinungen.)

wie nach Nährbodenwechsel wieder lange unverzweigte Fäden. Im tierischen Organismus waren die Mikroorganismen bis zum 6. Tage nachzuweisen. Danach verschwanden sie vollkommen. Ihre Form veränderte sich dabei zu uncharakteristischen Granula. In sehr alten Kulturen, die sich nicht mehr fortpflanzen ließen, fanden sich Fäden mit eigenartigen kugligen Auftreibungen, die sich stark färbten.

3. Färberisch war das Verhalten gramlabil; es bestand keine Säurefestigkeit.

4. Es gelang nach Impfung eines Kaninchens nach 4 Wochen ein spezifisch agglutinierendes Serum herzustellen, das die Identität aller gezüchteten Stämme bestätigte.

5. Tierpathogenität wurde nicht festgestellt.

Zum Schluß dieser Arbeit möchte ich den Damen und Herren des Institutes, die mich bei der technischen Durchführung der Versuche liebenswürdigerweise unterstützten, insbesondere Fräulein Meißner und Herrn Dr. Steuer, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Literatur.

1. Arustamow: Zur Morphologie und Biologie der Leptothrix. Zbl. f. B., Orig. 1889, Bd. 6, S. 349.
2. Brailowsky u. Lounkewicz: Contribution à l'étude de la flore microbienne de la bouche normale (nouveau-nés, enfants, adultes). Anales de l'inst. Pasteur 1915, 29, S. 375.
3. Chiari: Kolle-Wassermann, Hdb. d. Path. Mikroorg., II. Aufl. 1913, Bd. V, S . 289.
4. Dimitrijevicz-Speth, V.: Leptothrix, ihre Reinzüchtung und Zugehörigkeit zu den Fadenpilzen. Zbl. f. B., Orig. 1928, Abt. II, Bd. 74, S. 371; Ref. Bd. 92, S. 454.
5. Fränkel, B.: Kolle-Wassermann, Hdb. d. Path. Mikroorg., II. Aufl. 1913, Bd. V, S. 289.
6. Fürbringer: Zur Kenntnis der Leptothrixangina. Bln. Kl. W. 1921, Nr. 18, S. 437.
7. Galli-Valerio, B. und Bornaud, M.: Le Leptothrix pleuriticus chez l'homme. Zbl. f. B.; Ref. 1928, Bd. 90, S. 115.
8. Gins, H. A.: Die nicht versporenden Anaerobier der Mundhöhle. Zbl. f. B., Orig. 1934, S. 129.
9. Gins, H. A.: Untersuchungen über den bakteriellen Anteil der kariösen Zerstörung der Zähne. Münch. M. W. 1939, Nr. 20, S. 799.
10. Huntemüller, O.: Infektionen durch Trichobakterien. Kolle-Kraus-Ulenhuth, Hdb. d. Path. Mikroorg. 1928, III. Aufl., Bd. V, S. 1.
11. Roedetius, E. und Brack, E.: Leptothrixmykose der Zunge. Archiv f. klin. Chirurg. 1926, Bd. 141, S. 1.
12. Koch, F. E.: Reinkultur einer Leptothrix aus einem Nierenbecken bei pyelitis cystica. Zbl. f. B. Orig. 1936, Bd. 137, S. 288.
13. Lang: Durch Leptothrixinfektion bedingte Leberinfarcierung in einem Fall von kallösem Ulcus Duodeni. Virchow Arch. 1921, 234, S. 367.

14. Landau, H.: Über Di-ähnliche Stäbchen in der normalen Mundhöhle und ihre Beziehungen zu Leptothrix; Bln. Kl. W. 1916, S. 717.

15. Küster, E.: Die Flora der normalen Mundhöhle. Kolle-Wassermann, Hdb. d. Path. Mikroorg. 1913, II. Aufl., Bd. VI, S. 442.

16. Mendel, J.: Leptothrix astéroide. Zbl. f. B.; Ref. 1921, Bd. 70, S. 65.

17. Petruschky: Die pathogenen Trichomyceten und Trichobakterien; Kolle-Wassermann, Hdb. d. Path. Mikroorg., II. Aufl. 1913, Bd. V, S. 267.

18. Joseph, A.: Über Angina Leptothrica. D. Med. W. 1929, S. 656.

19. Verhoeff, F. H.: Parinauds conjunctivitis, a mycotic disease due to a hitherto undiscribed filamentateous organism. Zbl. f. B.; Ref. 1914, Bd. 60, S. 466.

Inhalts-Verzeichnis

A. Bisherige Ergebnisse:

1. Definition der Leptotricheen 5
2. Überblick über Systematik, Morphologie, Züchtung und Kultur 6
3. Pathogenität 11

B. Eigene Ergebnisse:

1. Untersuchungsmaterial 15
2. Versuchsanordnung 17

I. Kulturelles Verhalten 17
II. Morphologisches Verhalten 24
III. Färberisches Verhalten 29
IV. Serologisches Verhalten 29
V. Tierpathogenität 30

C. Zusammenfassung 30

Abbildungen

Lebenslauf.

Ich, Rudolf Pürschel, wurde am 29. Juli 1914 als Sohn des 1914 in Rußland gefallenen Konditoreibesitzers Fritz Pürschel zu Ohlau (Schlesien) geboren. Ich besuchte die Vorschule und das Staatl. Realgymnasium zu Ohlau. Im Jahre 1933 bestand ich daselbst die Reifeprüfung und studierte nach Teilnahme am freiwilligen Werkhalbjahr 1933 Medizin in Breslau, Kiel und München. Am 1. April trat ich als Sanitätsoffizier-Anwärter in die Kriegsmarine ein und wurde am 25. September 1938 zum Kadetten ernannt und am 5. Juli 1939 zum Fähnrich befördert. Am 7. September 1939 bestand ich in Breslau die medizinische Staatsprüfung und erhielt meine Bestallung als Arzt ebenfalls mit Wirkung vom 7. September 1939. Am 1. Oktober 1939 wurde ich zum Marineassistenzarzt befördert.

Rudolf Pürschel,
Marineassistenzarzt.